

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Получение рекомбинантного штамма *Komagataella phaffii* – продуцента протеиназы К из *Tritirachium album*

А.Б. Беклемишев^{1,2}✉, М.Б. Пыхтина^{1,2}, Я.М. Куликов^{1,2}, Т.Н. Горячковская², Д.В. Бочков², С.В. Сергеева²,
А.Р. Васильева², В.П. Романов², Д.С. Новикова³, С.Е. Пельтек²✉

¹ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Акционерное общество «Эфирное», г. Алексеевка, Белгородская область, Россия

✉ beklem@niibch.ru; peltek@bionet.nsc.ru

Аннотация. Объектами исследования являлись рекомбинантные штаммы *Komagataella phaffii* K51, несущие интегрированный в их геном гетерологичный ген протеиназы К (PK-w) из *Tritirachium album*, а также препарат рекомбинантной протеиназы К, полученный из этих штаммов. Целью работы было изучение возможности получения рекомбинантных штаммов *K. phaffii* K51, обеспечивающих высокий уровень синтеза функционально активной протеиназы К из *T. album*, и анализ ферментативной активности полученного рекомбинантного энзима. В работе использованы методы компьютерного анализа первичной структуры гена протеиназы К, молекулярно-биологические методы (ПЦР, электрофорез ДНК в агарозных гелях, электрофорез белков в SDS-ПААГ в денатурирующих условиях, спектрофотометрия, методы количественного определения активности протеаз), гено-инженерные методы (методы клонирования и селекции генов в бактериальных клетках *Escherichia coli* str. TOP10 и в митотрофных дрожжах *K. phaffii* str. K51). Спроектирован ген природной протеиназы К (PK-w), оптимизированный для экспрессии в дрожжах *K. phaffii* K51. Осуществлены синтез и клонирование синтезированного гена протеиназы К в составе вектора pPICZα-A в клетках *E. coli* str. TOP10. Ген протеиназы К встроен в векторную плазмиду pPICZα-A таким образом, чтобы на последующем этапе переклонирования в клетках дрожжей обеспечить его эффективную экспрессию под контролем промотора и терминатора гена *AOX1*, а продукт экспрессии клонированного гена содержал сигнальный пептид альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* для обеспечения секреции белка в культуральную жидкость. Проведено переклонирование рекомбинантной плазмиды (pPICZα-A/PK-w) в клетках дрожжей *K. phaffii* str. K51. Получен рекомбинантный штамм *K. phaffii* K51, несущий синтетический ген протеиназы К и обеспечивающий его экспрессию в дрожжах и секрецию в культуральную среду. Приблизительный выход рекомбинантной протеиназы К после четырех суток культивирования дрожжевых рекомбинантных клонов составил 25 мкг/мл. Полученный препарат рекомбинантной протеазы обладает высокой удельной протеолитической активностью, составляющей ~5000 Ед/мг.

Ключевые слова: протеиназа К; клонирование гена; *Komagataella phaffii*; экспрессия гена; активность фермента.

Для цитирования: Беклемишев А.Б., Пыхтина М.Б., Куликов Я.М., Горячковская Т.Н., Бочков Д.В., Сергеева С.В., Васильева А.Р., Романов В.П., Новикова Д.С., Пельтек С.Е. Получение рекомбинантного штамма *Komagataella phaffii* – продуцента протеиназы К из *Tritirachium album*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021;25(8): 882-888. DOI 10.18699/VJ21.102

Creation of a recombinant *Komagataella phaffii* strain, a producer of proteinase K from *Tritirachium album*

А.В. Beklemishev^{1,2}✉, М.В. Pykhtina^{1,2}, Ya.M. Kulikov^{1,2}, T.N. Goryachkovskaya², D.V. Bochkov², S.V. Sergeeva²,
A.R. Vasileva², V.P. Romanov², D.S. Novikova³, S.E. Peltek²✉

¹ Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Efirnoe Joint-Stock Company, Alekseyevka, Belgorod region, Russia

✉ beklem@niibch.ru; peltek@bionet.nsc.ru

Abstract. The objects of the study were recombinant clones of *Komagataella phaffii* K51 carrying the heterologous proteinase K (PK-w) gene from *Tritirachium album* integrated into their genome as well as samples of recombinant proteinase K isolated from these clones. The aims of this work were i) to determine whether it is possible to create recombinant *K. phaffii* K51 clones overexpressing functionally active proteinase K from *T. album* and ii) to analyze the enzymatic activity of the resulting recombinant enzyme. The following methods were used: computational analysis of primary structure of the proteinase K gene, molecular biological methods (PCR, electrophoresis of DNA in an agarose gel, electrophoresis of proteins in an SDS polyacrylamide gel under denaturing conditions, spectrophotometry, and quantitative assays of protease activity), and genetic engineering techniques (cloning and selection of genes in bacterial cells *Escherichia coli* TOP10 and in the methylotrophic yeast *K. phaffii* K51). The gene encoding natural proteinase K (PK) was designed and optimized for expression in *K. phaffii* K51. The proteinase K gene was synthesized and cloned

within the plasmid pPICZa-A vector in *E. coli* TOP10 cells. The proteinase K gene was inserted into pPICZa-A in such a way that – at a subsequent stage of transfection into yeast cells – it was efficiently expressed under the control of the promoter and terminator of the *AOX1* gene, and the product of the exogenous gene contained the signal peptide of the *Saccharomyces cerevisiae* α -factor to ensure the protein's secretion into the culture medium. The resultant recombinant plasmid (pPICZa-A/PK-w) was transfected into *K. phaffii* K51 cells. A recombinant *K. phaffii* K51 clone was obtained that carried the synthetic proteinase K gene and ensured its effective expression and secretion into the culture medium. An approximate productivity of the yeast recombinant clones for recombinant proteinase K was 25 $\mu\text{g/mL}$ after 4 days of cultivation. The resulting recombinant protease has a high specific proteolytic activity: $\sim 5,000$ U/mg.
Key words: proteinase K; gene cloning; *Komagataella phaffii*; gene expression; enzymatic activity.

For citation: Beklemishev A.B., Pykhtina M.B., Kulikov Ya.M., Goryachkovskaya T.N., Bochkov D.V., Sergeeva S.V., Vasileva A.R., Romanov V.P., Novikova D.S., Peltek S.E. Creation of a recombinant *Komagataella phaffii* strain, a producer of proteinase K from *Tritirachium album*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8):882-888. DOI 10.18699/VJ21.102

Введение

Более 70 % ферментов, применяемых в различных областях промышленности, – гидролазы (Kudryavtseva et al., 2008; Yin et al., 2014), причем на долю протеаз приходится свыше 30 % от всего рынка промышленных ферментов (Kulkarni et al., 1999; Gupta et al., 2002; Koga et al., 2014; Singh et al., 2016). Это объясняется их активным использованием в различных областях промышленности, в частности в производстве моющих средств и утилизации отходов, в пищевой, молочной, кожевенной, фармацевтической и текстильной промышленности. Возросшие потребности в получении протеаз обусловлены в последние годы острой необходимостью производства новых пищевых продуктов из отходов сельхозпереработки растительного сырья и переработки мяса и рыбы, а также высококачественных и эффективных моющих средств. В последние три десятилетия в различных областях промышленности, а также в практическом здравоохранении находят широкое применение протеиназы из различных источников (бактерии, бациллы, грибы). Наиболее изучаемая группа протеолитических ферментов – сериновые протеиназы бактерий. Они интенсивно используются в фармацевтической промышленности, тканевой инженерии, системной энзимотерапии (Gupta et al., 2002; Kudryavtseva et al., 2008; Yin et al., 2014).

Препараты, содержащие в своем составе протеиназы, применяются в ряде областей медицины: в хирургии – для лечения трофических язв, абсцессов, флегмон, остеомиелита и других гнойно-воспалительных процессов; в стоматологии – при лечении кариеса, пульпитов, периодонтитов, пародонтоза и его осложнений; в пульмонологии – в качестве муколитического препарата для лечения различных форм пневмоний и бронхитов (ингаляционное введение).

О перспективности применения сериновых протеаз в медицинских целях свидетельствуют исследования многих авторов (Yariswamy et al., 2013; Muthu et al., 2017; Belov et al., 2018; Абатуров, 2020; Осмоловский и др., 2020). В частности, одна из главных проблем, с которой сталкиваются врачи при лечении кожных ран и ожогов у людей с ослабленным иммунитетом, – появление на них биопленки, образованной условно-патогенной микрофлорой (золотистым и эпидермальным стафилококком, микрококком, псевдомонадой), под которую не могут проникнуть антибиотики, вследствие чего заживление ран замедляется.

Для деградации различных компонентов экстрацеллюлярного матрикса биопленок в настоящее время разрабатываются препараты на основе комплекса ферментов: протеаз, в том числе протеиназы К, гликозидаз, дезоксирибонуклеаз (Абатуров, 2020). Одна из перспективных областей применения протеиназ – это создание на их основе тромболитических препаратов. Таким образом, разработка новых эффективных лекарственных препаратов на основе ферментов бактериального происхождения – перспективное направление современной медицины, микробиологии и биотехнологии.

Наибольшее применение имеют термостабильные протеазы, поскольку они, во-первых, характеризуются большей скоростью катализа, во-вторых, обеспечивают защиту реакционной смеси и продуктов энзиматического превращения от микробного загрязнения за счет осуществления ими катализируемых реакций при высоких температурах. В качестве рекомбинантных штаммов – продуцентов термостабильных протеаз – сконструированы как бактериальные, так и дрожжевые штаммы, причем во многих работах показано, что метилотрофные дрожжи *Komagataella phaffii* осуществляют большую продукцию рекомбинантных протеаз, чем бактериальные (Kim et al., 2005; Latiffi et al., 2013; Yu et al., 2014; Ma et al., 2016; Shu et al., 2016; Kangwa et al., 2018; Pereira et al., 2020). Кроме того, продуцируемые дрожжами протеазы, как правило, секретируются в культуральную среду в растворимом функционально активном состоянии (Yang et al., 2016). Особое внимание вызывают протеиназы, проявляющие свою активность в широком диапазоне температур и pH среды.

Несомненный интерес представляет решение задачи получения дрожжевого суперпродуцента протеиназы из *Tritirachium album* (протеиназа К), поскольку эта протеиназа имеет ряд очень важных в практическом отношении достоинств: обладает широкой специфичностью, показывает наибольшую активность при высоких температурах реакции от 37 до 60 °C, активна в широком диапазоне pH (4–12) и не ингибируется ионными и неионными детергентами. Решению вышеназванной проблемы посвящено настоящее исследование.

Материалы и методы

Материалы. Все химические реагенты аналитической чистоты приобретены в Sigma-Aldrich (США) или в АО «Рехахим» (Москва, Россия). Эндонуклеазы рестрикции были

получены в фирме «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия), ДНК-лигаза T4 и ДНК-полимераза Phusion – в фирме Thermo Fisher Scientific Inc (США), олигонуклеотиды – в ООО «Биосинтез» (Новосибирск, Россия). Дрожжевой экстракт, бактопептон и триптон производства фирмы Difco использованы для приготовления среды LB для выращивания клеток *Escherichia coli*. Среда для культивирования дрожжей (YPD, VMGY, BMM2, BMM10) готовили, как указано в протоколе производителя EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen, США). Среда – Игла (MEM) («Биолот», Россия), дитиотреитол, йодацетамид (Bio-Rad, США), свиной трипсин (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega, США). Ионообменные смолы DEAE-Sephrose FF и SP Sepharose FF приобретены в фирме GE Healthcare Bioscience (Швеция). Вода, использованная в работе, была деионизирована и автоклавирована.

Штаммы бактерий и дрожжей, плазмидные векторы. Дрожжи *K. phaffii* K51 из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) № Y-4935, *E. coli* str. TOP10 и вектор pPICZα-A получены в фирме Invitrogen Inc. (США).

Буферные растворы и питательные среды. Растворы и буферы готовили с применением деионизированной автоклавированной воды. Клоны *E. coli*, содержащие плазмиду pPICZα-A и ее производные, отбирали на чашках с агаром LB (1 % триптона, 0.5 % дрожжевого экстракта, 0.5 % NaCl, 1.8 % агара, 50 мкг/мл зеоцина) с низким содержанием соли. Дрожжевые клетки выращивали в среде YPD (2 % дрожжевого пептона, 1 % дрожжевого экстракта, 2 % декстрозы). Трансформанты дрожжей выращивали и отбирали на чашках с агаром YPD (2 % агара и различные концентрации зеоцина (500 и 2000 мкг/мл)). Культивирование отобранных клонов дрожжей проводили также в среде VMGY (1 % дрожжевого экстракта, 2 % пептона, 100 мМ фосфат калия, pH 6.0, 1.34 YNB, 4×10^{-5} % биотина и 2 % глицерина). Для индукции промотора гена *AOX1* использовали культивирование клонов последовательно сначала в среде BMM2 (1.34 % YNB, 4×10^{-5} % биотина, 1 % метанола), а затем в среде BMM10 (1.34 % YNB, 4×10^{-5} % биотина, 5 % метанола).

Конструирование рекомбинантной плазмиды pPICZα-A/PK-w. Нуклеотидная последовательность синтетического гена, кодирующего природную протеиназу K (протеаза K; эндопептидаза K; E.C.3.4.21.64) (далее – PK-w), из *T. album*, была сконструирована и оптимизирована для экспрессии в дрожжах *K. phaffii*. Оптимизированный ген протеазы PK-w был синтезирован фирмой GenScript (США). Ген протеазы PK-w был клонирован в составе плазмиды pPICZα-A по сайтам *XhoI* и *XbaI* в клетках *E. coli*.

Полупрепаративная наработка рекомбинантной протеиназы K (PK-w). Генетически модифицированный штамм дрожжей выращивали в 250 мл среды VMGY с 1 % глицерином в литровых колбах на орбитальном шейкере при 250 об/мин в течение 48 ч при 28 °С. Далее проводили индукцию биосинтеза белка 1 % метанолом (каждые сутки по 25 мл 10 % метанола) в течение четырех суток. На четвертые сутки определяли протеолитическую активность в культуральной жидкости.

Концентрацию белка в растворах выявляли тремя методами: а) по поглощению раствора белка при 280 нм с учетом величины экстинкции белка; б) по определению плотности окрашенной полосы белка в геле; в) по Брэдфорду с помощью набора Quick Start™ Bradford 1×Dye Reagent согласно инструкции производителя.

Определение протеазной активности рекомбинантной протеиназы K по казеину. Протеолитическую активность устанавливали методом Кунитца с использованием казеина из коровьего молока (Sigma-Aldrich) в качестве субстрата (Биссвангер, 2010). Для этого 0.4 мл 2 раствора казеина в 10 мМ Трис-НСl буфере (pH 8.0), содержащего 10 мМ CaCl₂, нагревали до 55 °С и вносили в него 0.2 мл раствора фермента в том же буфере. Смесь инкубировали при 55 °С 10 мин, а затем реакцию останавливали добавлением 1 мл 1.2 М трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Раствор сравнения подвергали тем же процедурам, за исключением того, что раствор фермента вносили в раствор казеина после добавления трихлоруксусной кислоты. Образцы центрифугировали 5 мин при 10000 g при 5 °С и определяли поглощение супернатанта при длине волны 275 нм. Одна единица активности соответствует количеству протеазы, приводящей за 1 мин при 55 °С к такому же значению поглощения, как 1 мкмоль тирозина (по калибровочной кривой). Калибровочную кривую строили по тирозину.

Определение протеазной активности в культуральной жидкости по азоказеину. Культуральную жидкость центрифугировали 10 мин, при +4 °С, 10000 g для осаждения клеток. Отбирали супернатант для определения протеазной активности.

Реакционную смесь с 0.5 мл 0.2 % раствора азоказеина в 50 мМ Трис-глициновом буфере (pH 8) и 0.25 мл супернатанта нагревали на водяной бане при 55 °С в течение 40 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 1.2 М трихлоруксусной кислоты. Раствор сравнения, содержащий 0.5 мл 0.2 % раствора азоказеина в 50 мМ Трис-глициновом буфере (pH 8) без супернатанта, нагревали на водяной бане при 55 °С в течение 40 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 1.2 М трихлоруксусной кислоты. После этого добавляли 0.25 мл супернатанта. Продукт реакции гидролиза азоказеина определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 440 нм.

Результаты

Проектирование векторной конструкции, предназначенной для экспрессии гена протеиназы K в дрожжах *K. phaffii* K51

Для получения дрожжевого продуцента протеиназы K (протеаза K, эндопептидаза K; E.C.3.4.21.64) ген протеиназы *Tritirachium album* был оптимизирован для экспрессии в метилотрофных дрожжах *K. phaffii* K51. Аминокислотная последовательность белка-предшественника протеиназы K и схема расположения его доменов представлены на рис. 1.

Синтезированный ген кодировал только препептид и аминокислотную последовательность зрелого белка.

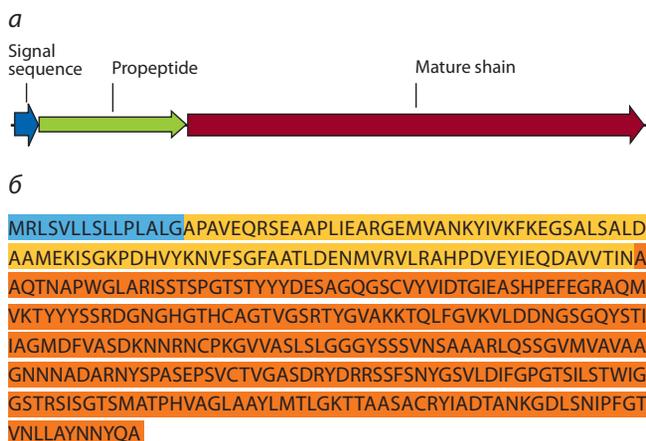


Рис. 1. Схема доменной структуры протеиназы К (а) и аминокислотная последовательность белка-предшественника РК-в (б).

Голубым цветом выделен сигнальный пептид, желтым – препептид (про-домен), оранжевым – зрелый белок.

В качестве сигнала секреции фермента использован сигнальный пептид альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae*, кодируемый фрагментом вектора pPICZα-A (данные не представлены).

Клонирование рекомбинантной плазмиды pPICZα-A/PK-w в клетках *E. coli* TOP10

Электрокомпетентные клетки *E. coli* str. TOP10 трансформировали рекомбинантными плазмидами pPICZα-A/PK-w с применением электропоратора (Bio-Rad). Трансформированные клетки инокулировали в 1 мл среды LB и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч в орбитальном шейкере при 140 об/мин. Суспензии клеток высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей 50 мкг/мл зеоцина и инкубировали 16 ч при +37 °С. На всех чашках выросло по 150–200 колоний. По 10 выросших колоний перекальывали на отдельные чашки Петри с агаризованной низкосолевогой средой LB, содержащей 50 мкг/мл зеоцина, и использовали для приготовления термолизатов с целью выявления методом ПЦР колоний, несущих рекомбинантную плазмиду pPICZα-A/PK-w. Полимеразную цепную реакцию осуществляли с помощью пары праймеров, специфичных для областей вектора pPICZα-A, фланкирующих встроенный ген: прямой праймер № 324-AOX1-F, 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3', и обратный праймер № 325-AOX1-R, 5'-GCAAATGGCATCTCTGACATCC-3'. Анализ размеров ампликонов выполняли электрофорезом в 0.8 % агарозном геле, содержащем бромистый этидий. ПЦР-положительные клоны были отобраны для последующей наработки рекомбинантных плазмид для последующего переклонирования их в клетках дрожжей.

Результаты анализа клонов *E. coli* TOP10 методом ПЦР колоний на наличие в них рекомбинантной плазмиды pPICZα-A/PK-w со вставкой гена протеиназы К приведены на рис. 2.

Ампликоны, полученные на двух рекомбинантных плазмидах, содержащих встроенный ген протеиназы К, имеют теоретически ожидаемый размер: ~1626 п. н. (см.

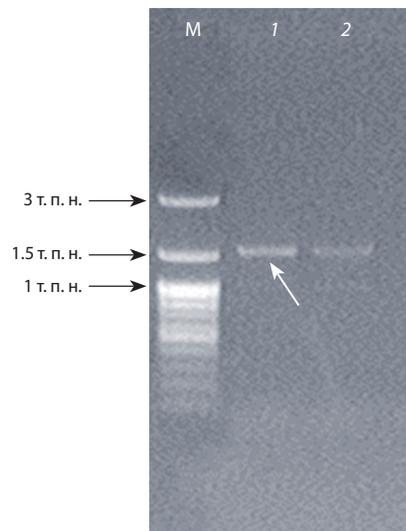


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных амплификацией участка рекомбинантной плазмиды pPICZα-A/PK-w, содержащей ген протеиназы К.

Стрелкой указан фрагмент ДНК, использованный в дальнейшей работе. Дорожки: М – маркер молекулярных масс ДНК SibEnzyme (100–3000 п. н.); 1 и 2 – ампликоны гена протеиназы К из двух рекомбинантных клонов, содержащих плазмиды со вставкой гена PK-w.

рис. 2). Отобранный клон с рекомбинантной плазмидой pPICZα-A/PK-w со вставкой гена протеиназы К (PK-w), использовали для дальнейших работ, связанных с наработкой плазмиды, ее линейаризации эндонуклеазой рестрикции BstX1 и последующего клонирования в клетках дрожжей *K. phaffii* K51.

Клонирование гена протеиназы К в клетках дрожжей *K. phaffii* K-51 и скрининг трансформантов

На первом этапе осуществляли наработку отобранного клона *E. coli* в 100 мл среды LB с последующим выделением из клеток плазмидной ДНК pPICZα-A/PK-w с помощью набора GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit. Анализ выделенного препарата плазмиды выполняли посредством электрофореза в 0.8 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

Концентрацию препарата плазмидной ДНК определяли с применением флуориметра Qubit (Invitrogen). В итоге было получено ~25 мкг очищенной рекомбинантной плазмиды pPICZα-A/PK-w. Приблизительно 5–10 мкг выделенной плазмиды pPICZα-A/PK-w линейаризовали перевариванием рестриктазой BstX1 и использовали для трансформации клеток *K. phaffii* str. K51 электропорацией. По окончании реакции рестрикции проводили фенол-хлороформную экстракцию ДНК с последующим ее осаждением изопропанолом и промывкой 70 % этанолом. Осадки ДНК растворяли в 10 мкл бидистиллированной H₂O, замораживали и хранили при –20 °С. Полноту реакции гидролиза плазмиды контролировали электрофорезом продуктов рестрикции в 0.8 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Судя по результатам электрофоретического анализа, основная масса препарата плазмиды была гидролизована эндонуклеазой рестрикции BstX1.

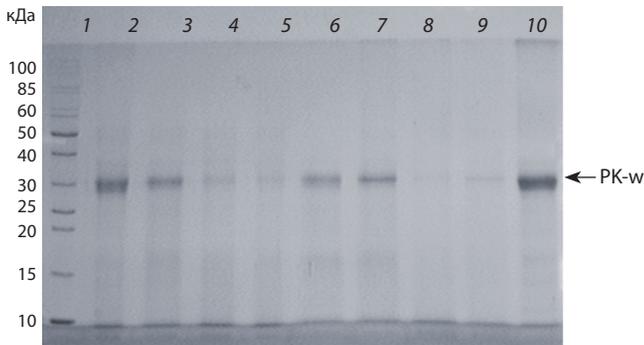


Рис. 3. Электрофореграмма белков, продуцируемых исследуемыми клонами дрожжей, трансформированных плазмидой pPICZαA/PK-w.

Дорожки: 1 – маркер молекулярных масс Thermo Scientific (10–200 кДа); 2–10 – белки, продуцируемые и секретируемые анализируемыми клонами.

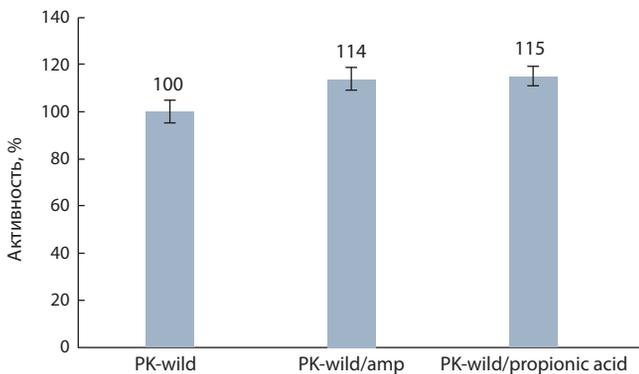


Рис. 4. Протеолитическая активность культуральной жидкости дрожжевого рекомбинантного клона № 10, выращенного в полупрепаративных условиях в присутствии ампициллина (PK-wild/amp), пропионовой кислоты (PK-wild/propionic acid) и без использования антибактериальных агентов (PK-wild). Протеолитическую активность культуральной жидкости без использования антибактериальных агентов (PK-wild) принимали за 100 %.

Для трансформации электрокомпетентных дрожжевых клеток брали по 13–15 мкг плазмидной ДНК, растворенной в 10 мкл бидистиллированной H₂O. Электропорацию осуществляли с помощью электропоратора Gene Pulser Xcell Total System Electroporator (Bio-Rad).

Трансформированные клетки после предварительного выращивания на орбитальном шейкере при 200 об/мин в течение 2 ч при 27 °С в пробирках, содержащих 1 мл среды YPD, высевали на чашки Петри с агаризованной средой YPD, содержащей 500 и 2000 мкг/мл зеоцина. Чашки убирали в термостат на 30 °С на 3–5 сут. На четвертый день после трансформации клеток плазмидой pPICZαA/PK-w на чашках с 500 мкг/мл зеоцина выросло множество отдельных колоний, на чашках с 2000 мкг/мл зеоцина – от 50 до 100 колоний.

Зеоцин-резистентные трансформанты, выросшие на чашках с концентрацией зеоцина 2000 мкг/мл, оценивали на способность синтезировать и секретировать целевой белок с помощью культивирования отобранных клонов в 96-глубоколуночных планшетах (Axugen Scientific). На скрининг брали 20 колоний, которые вносили в лунки

96-глубоколуночных планшетов. Параллельно эти же колонии пересеивали на отдельные чашки Петри с агаризованной средой с той же концентрацией зеоцина в прономерованные участки.

Культивирование отобранных клонов проводили в лунках 96-глубоколуночных планшетов в 300 мкл среды VMGY на орбитальном шейкере при 250 об/мин в течение 48 ч при +28 °С. Затем в каждую лунку вносили по 250 мкл среды VMM2. В следующие три дня в лунки вносили по 50 мкл среды VMM10. На четвертые сутки культуральные жидкости из каждой лунки центрифугировали при 6000 об/мин 5 мин для осаждения клеток и полученные супернатанты анализировали на присутствие целевых белков с помощью SDS-ПААГ.

Образцы для электрофореза готовили следующим образом: к супернатантам добавляли 10 ТХУ для концентрации белков. Белковые преципитаты промывали ацетоном, ресуспендировали в в однократном Трис-глициновом буфере, вносили 4-кратный денатурирующий буфер, кипятили и затем разделяли белки в 12.5 % геле. По результатам электрофореза отбирали культуральные жидкости клонов, продуцирующих максимальные количества белков с молекулярными массами, соответствующими молекулярной массе природной протеиназы К, ~30 кДа, для определения в них содержания рекомбинантной протеиназы К и оценки ее ферментативной активности. Результаты электрофоретического анализа белков, продуцируемых и секретируемых рекомбинантными клонами дрожжей, представлены на рис. 3.

Все позитивные клоны продуцируют мажорный белок с молекулярной массой ~29–30 кДа, которая соответствует молекулярной массе зрелой протеиназы К ~30 кДа (рис. 4). По результатам электрофореза для дальнейших работ был отобран клон № 10, продуцирующий наибольшее количество рекомбинантного белка с молекулярной массой ~29–30 кДа. Выход рекомбинантной протеазы PK-w после 4 сут культивирования дрожжевого рекомбинантного клона № 10 в планшете составил 25 мкг/мл.

Для контроля бактериальной контаминации при наработке препаративных количеств рекомбинантного использована пропионовая кислота. На рис. 4 показано, что применение пропионовой кислоты в концентрации 0.025 % сопоставимо с использованием ампициллина в концентрации 0.2 мг/мл.

Микроскопический анализ культур не выявил присутствия бактерий, однако использование ампициллина и пропионовой кислоты несколько увеличивает наработку целевого продукта.

Дрожжевой рекомбинантный клон № 10 был использован для полупрепаративной наработки ферментного препарата.

Определение протеазной активности рекомбинантного белка, продуцируемого клоном № 10

Исследованный препарат рекомбинантного белка с молекулярной массой ~29–30 кДа обладал высокой удельной протеолитической активностью, составляющей ~5000 Ед/мг. Этот результат свидетельствует о том, что анализируемый рекомбинантный белок является протеиназой К (PK-w).

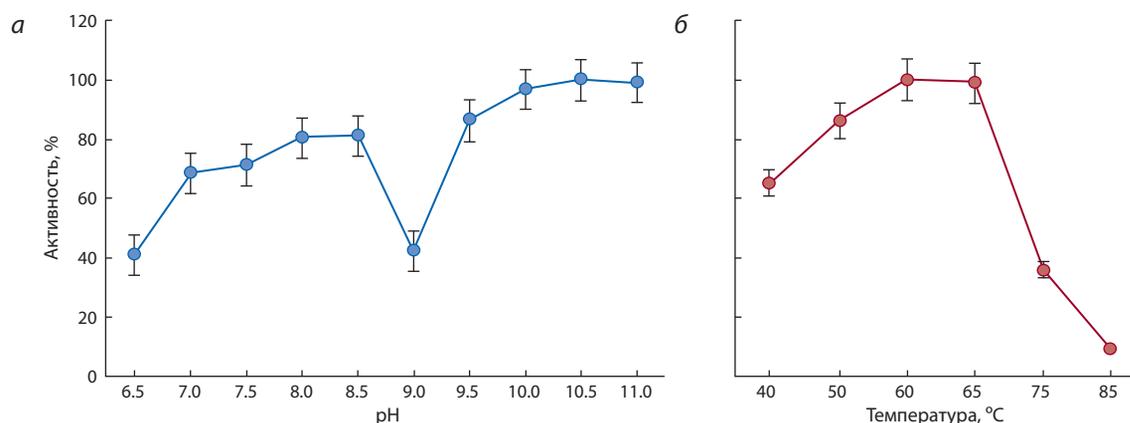


Рис. 5. Зависимость активности рекомбинантной протеиназы К от рН и температуры.

Изучена зависимость активности полученной рекомбинантной протеиназы К от величины рН среды и температуры проведения реакции (рис. 5). Оптимум ферментативной активности рекомбинантной протеиназы К находится в области рН 10–11, хотя фермент активен и при рН от 9.5 до 6.5 (см. рис. 5, а). Резкое падение активности наблюдается при рН 9.0, а также от 4.0 и ниже. Диапазон оптимальных температур для проявления протеазной активности рекомбинантного фермента лежит в области от 40 до 65 °С (см. рис. 5, б).

Хроматографическая очистка полученной рекомбинантной протеиназы К

Все операции проводили при температуре, не превышающей 5 °С. Культуральную жидкость, наработанную рекомбинантным клоном № 10, отделяли центрифугированием в течение 25 мин при 4000 об/мин. Супернатант очищали от низкомолекулярных примесей и концентрировали в 20 раз методом ультрафильтрации с использованием центрифужных концентраторов.

Очистку фермента от примесных белков осуществляли методом ионообменной хроматографии на анионите – DEAE-Sepharose 6НF. Элюцию проводили 0.05 М раствором хлорида натрия в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 7.2). Фракции, где была обнаружена протеолитическая активность, объединяли, концентрировали с использованием центрифужных концентраторов и либо лиофильно сушили, либо хранили в морозильной камере холодильника в 50 % глицерине.

Очищенный рекомбинантный белок анализировали электрофорезом в 12.5 % SDS-ПААГ (рис. 6). Рекомбинантный белок представлен на геле одной мажорной полосой с размером в области ~26.5–27.0 кДа (см. рис. 6). Каких-либо примесных белков на геле нет. Активность очищенного белка составила 49800 Ед/мг по азоказеину и 5000 Ед/мг по казеину. Таким образом, получен высокоочищенный препарат рекомбинантной протеиназы К.

Закключение

Осуществлены проектирование и оптимизация нуклеотидной последовательности, кодирующей пробелок природной протеиназы К (PK-w) из *T. album* для обеспечения

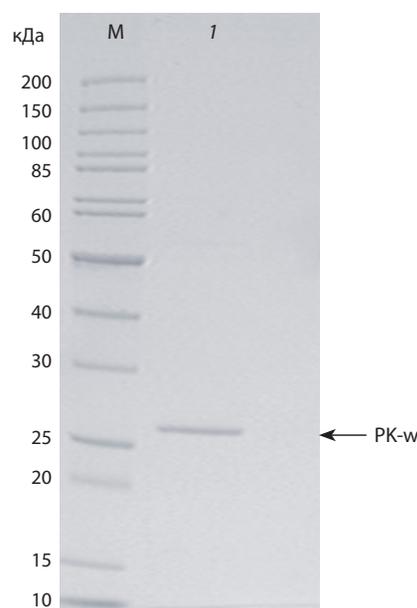


Рис. 6. Электрофореграмма препарата очищенного рекомбинантного белка, продуцируемого дрожжевым клоном № 10.

Электрофорез проводили в 12.5 % SDS-ПААГ. Дорожки: М – маркер молекулярных масс Thermo Scientific (10–200 кДа); 1 – хроматографически очищенный рекомбинантный белок.

ее эффективной экспрессии в клетках дрожжей *K. phaffii*. Синтезированный ген протеиназы К был клонирован в составе вектора pPICZα-A в клетках *E. coli* str. TOP10, а затем переклонирован в клетках дрожжей *K. phaffii* str. K51.

Получен рекомбинантный клон *K. phaffii* K51, несущий ген рекомбинантной протеиназы К и обеспечивающий его экспрессию в дрожжах, в культуральную среду. Нароботан образец рекомбинантной протеиназы К. Определена протеазная активность препарата рекомбинантной протеиназы К (PK-w) с использованием в качестве субстратов казеина и азоказеина. Препарат фермента обладает высокой удельной протеолитической активностью, составляющей ~5000 Ед/мг. Оптимум ферментативной активности рекомбинантной протеиназы К находится в области рН 10–11 и температуре от 40 до 65 °С.

Список литературы / References

- Абатуров А.Е. Протеазы, деградирующие биопленочный матрикс. *Здоровье ребенка*. 2020;15(3):187-194. DOI 10.22141/2224-0551.15.3.2020.204554.
[Abaturov A.E. Proteases that degrade the biofilm matrix. *Zdorov'ye Rebenka = Child's Health*. 2020;15(3):187-194. DOI 10.22141/2224-0551.15.3.2020.204554. (in Russian)]
- Биссвангер Х. Практическая энзимология. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010;154-156.
[Bisswanger H. Practical Enzymology. Moscow: Binom Publ., 2010;154-156. (in Russian)]
- Осмоловский А.А., Орехова А.В., Конти Э., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Получение и стабильность комплексного препарата протеиназ *Aspergillus ochraceus* L-1 с фибринолитической и антикоагулянтной активностью. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология*. 2020;75(3):158-163.
[Osmolovsky A.A., Orekhova A.V., Konti E., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Production and stability of the proteinase complex from *Aspergillus ochraceus* L-1 with fibrinolytic and anticoagulant activity. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2020;75(3):130-135.]
- Belov A.A., Vaniushenkova A.A., Dosadina E.E., Khanafina A.A. New textile dressings based on biodegradable polymers containing proteinases for wounds and burns treatment. *Wounds and Wound Infections. The prof. B.M. Kostyuchenok Journal*. 2018;5(1):16-26. DOI 10.25199/2408-9613-2018-5-1-16-26. (in Russian)
- Gupta R., Beg Q., Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2002;59(1):15-32. DOI 10.1007/s00253-002-0975-y.
- Kangwa M., Salgado J.A.G., Fernandez-Lahore H.M. Identification and characterization of N-glycosylation site on a *Mucor circinelloides* aspartic protease expressed in *Pichia pastoris*: effect on secretion, activity and thermo-stability. *AMB Express*. 2018;8(1):157. DOI 10.1186/s13568-018-0691-3.
- Kim T., Lei X.G. Expression and characterization of a thermostable serine protease (TfpA) from *Thermomonospora fusca* YX in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2005;68(3):355-359. DOI 10.1007/s00253-005-1911-8.
- Koga Y., Tanaka S.-I., Sakudo A., Tobiume M., Aranishi M., Hirata A., Takano K., Ikuta K., Kanaya S. Proteolysis of abnormal prion protein with a thermostable protease from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2014;98(5):2113-2120. DOI 10.1007/s00253-013-5091-7.
- Kudryavtseva O., Dunaevsky Y., Kamzolkina O., Belozersky M. Fungal proteolytic enzymes: features of the extracellular proteases of xylophilic basidiomycetes. *Microbiology*. 2008;77(6):643-653. DOI 10.1134/S0026261708060015.
- Kulkarni N., Shendye A., Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev*. 1999;23(4):411-456. DOI 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407.x.
- Latiffi A.A., Salleh A.B., Rahman R.N., Oslan S.N., Basri M. Secretory expression of thermostable alkaline protease from *Bacillus stearo-thermophilus* FI by using native signal peptide and α -factor secretion signal in *Pichia pastoris*. *Genes Genet. Syst*. 2013;88(2):85-91. DOI 10.1266/ggs.88.85.
- Ma X., Liu Y., Li Q., Liu L., Yi L., Ma L., Zhai C. Expression, purification and identification of a thermolysin-like protease, neutral protease I, from *Aspergillus oryzae* with the *Pichia pastoris* expression system. *Protein Expr. Purif*. 2016;128:52-59. DOI 10.1016/j.pep.2016.08.008.
- Muthu S., Gopal V.B., Soundararajan S., Nattarayan K., Narayan K.S., Lakshmiathan M., Malairaj S., Perumal P. Antibacterial serine protease from *Wrightia tinctoria*: Purification and characterization. *Plant Physiol. Biochem*. 2017;112:161-172. DOI 10.1016/j.plaphy.2017.01.003.
- Pereira W.E.S., da Silva R.R., de Amo G.S., Ruller R., Kishi L.T., Boscolo M., Gomes E., da Silva R. A collagenolytic aspartic protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 2020;191(3):1258-1270. DOI 10.1007/s12010-020-03292-z.
- Shu M., Shen W., Yang S., Wang X., Wang F., Wang Y., Ma L. High-level expression and characterization of a novel serine protease in *Pichia pastoris* by multi-copy integration. *Enzyme Microb. Technol*. 2016;92:56-66. DOI 10.1016/j.enzmictec.2016.06.007.
- Singh R., Kumar M., Mittal A., Mehta P.K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*. 2016;6(2):174. DOI 10.1007/s13205-016-0485-8.
- Yang H., Zhai C., Yu X., Li Z., Tang W., Liu Y., Ma X., Zhong X., Li G., Ma L. High-level expression of proteinase K from *Tritirachium album* limber in *Pichia pastoris* using multi-copy expression strains. *Protein Expr. Purif*. 2016;122:38-44. DOI 10.1016/j.pep.2016.02.006.
- Yariswamy M., Shivaprasad H.V., Joshi V., Nanjaraj Urs A.N., Nataraju A., Vishwanath B.S. Topical application of serine proteases from *Wrightia tinctoria* R. Br. (Apocyanaceae) latex augments healing of experimentally induced excision wound in mice. *J. Ethnopharmacol*. 2013;149(1):377-383. DOI 10.1016/j.jep.2013.06.056.
- Yin C., Zheng L., Chen L., Tan Q., Shang X., Ma A. Cloning, expression, and characterization of a milk-clotting aspartic protease gene (*Po-Asp*) from *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 2014;172(4):2119-2131. DOI 10.1007/s12010-013-0674-4.
- Yu X., Wang X., Zhong X., Tang W., Zhai C., Chen W., Ma L. Expression of the thermostable carboxypeptidase Taq gene in *Pichia pastoris* GS115. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2014;30(11):1791-1795.

ORCID ID

A.B. Beklemishev orcid.org/0000-0001-9732-1246
M.B. Pykhtina orcid.org/0000-0002-7808-9274
Ya.M. Kulikov orcid.org/0000-0001-6916-6875

T.N. Goryachkovskaya orcid.org/0000-0002-7445-0608
D.V. Bochkov orcid.org/0000-0002-0764-5800
S.E. Peltek orcid.org/0000-0002-7122-2546

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках реализации комплексного проекта по теме «Создание высокотехнологического производства высококачественных растительных пищевых белков» (Соглашение о предоставлении из федерального бюджета субсидии на развитие кооперации государственного научного учреждения и организации реального сектора экономики в целях реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологического производства № 075-11-2020-036 от 15.12.2020) в рамках Постановления Правительства РФ от 9 апреля 2010 г. № 218 на базе ИЦиГ СО РАН. Работа частично выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования «Протеомный анализ» Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (Новосибирск, Россия).
Авторы выражают благодарность А.С. Розанову, с.н.с. лаборатории биотехнологии ИЦиГ СО РАН, за предоставленный штамм дрожжей *Komagataella phaffii* K51.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.11.2021. После доработки 29.11.2021. Принята к публикации 29.11.2021.